研究用

TaKaRa

PrimerArray® Analysis Tool For Embryonic Stem Cells

説明書

v201212

PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells は、PrimerArray Embryonic Stem Cells（製品コード PH016、PN016）で得られたデータを解析するためのツールで、コントロールサンプルと 1 種類の未知サンプル間の比較が可能です。リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで算出された Ct 値を用いて ΔΔ Ct 法による相対定量解析を行い、結果をグラフで表示します。

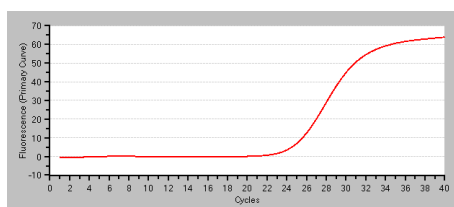
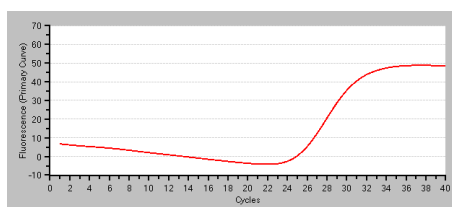
＊ PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells は、Microsoft® Office Excel® で作成されたマクロを含むファイルです。このファイルは、以下のバージョンのオペレーションシステム（OS）および Microsoft® Office Excel® で正常に動作することを確認しています。
Windows® XP operating system
Microsoft® Office Excel® 2003
Microsoft® Office Excel® 2007

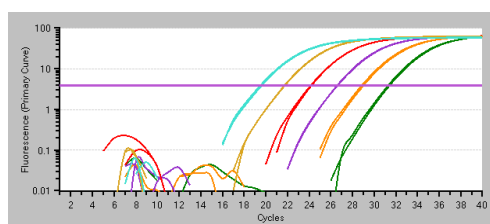
＊ 本解析ツールは、タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。
http://www.takara-bio.co.jp/primerarray_tool/2

I. Ct 値の算出と出力

リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析パラメーターを設定し、Ct 値を算出します。（操作方法の詳細は、各リアルタイム PCR 解析ソフトウェアの取扱説明書をご参照ください。）

（1）解析パラメーターの設定
ほとんどのリアルタイム PCR 解析ソフトウェアでは解析パラメーターが自動で設定されますが、まず、その設定が正しいことを確認し、適切でない場合にはマニュアルで設定し直してください。

ベースライン領域
増幅曲線が立ち上る手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が狭すぎる場合、十分なベースライン補正がなされません。逆に、ベースライン領域が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。

正しくベースラインが設定された例

ベースライン領域が広すぎる例

Threshold（閾値）
PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数（Log scale）で表示した際に増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。

正しく Threshold（閾値）が設定された例

（2）Ct 値の算出

Ct 値はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアにより自動的に算出されます。

（3）データの出力

Ct 値を Microsoft® Office Excel® または CSV などの形式で出力します（出力形式はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアによって異なります）。

※ リアルタイム PCR 解析ソフトウェアによっては、サンプル情報が設定されていないウェルや解析から除外（Omit）したウェルのデータ行は出力されないことがあります。そのような状態では、PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells へのデータ入力の際に誤りが生じやすくなりますので、全ウェルのデータが表示される状態で出力を行ってください。

II. 相対定量解析

PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells を用いてΔΔCt 法による相対定量解析を行います。

（1）PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells の起動

PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells のファイル（PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells.xls）を開きます。

（2）Plate の選択

実験に用いた PrimerArray の種類を選択し、Plate Select ボタンをクリックします。

（3）Control Sample データの入力

Plate Select ボタンをクリックすると、Control Sample のデータを入力するシート（ControlSampleData）に変わります。exp1（C 列）、exp2（D 列）、exp3（E 列）･･･の順に Ct 値を入力します（リアルタイム PCR 解析ソフトウェアから出力した Ct 値をコピー＆ペーストすると簡単に入力できます）。反復実験の結果は、最大 10 個まで入力することができます。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Symbol	Well							C
2			exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7
3	CTNNB1	A01	26.16	26.45	26.57				
4	FLT1	A02	26.5	26.56	26.55				
5	FN1	A03	28.39	28.43	28.49				
6	LAMA1	A04	20.51	20.58	20.56				
7	PDX1	A05	31.11	30.95	31.04				
8	PTEN	A06	22.56	22.41	22.52				
9	CCL2	A07	34.61	34.28	34.81				
10	ACTC1	A08	33.89	33.92	34.36				
11	AFP	A09	22.36	22.35	22.59				
12	CCR7	A10	33.48	33.95	33.83				
13	BRIX1	A11	23.63	23.62	23.72				
14	GUSB	A12	23.87	23.76	24.04				
15	CD34	B01	31.59	31.54	31.3				
16	CD9	B02	24.69	25.09	25.39				
17	CDH5	B03	30.78	31.45	31.1				
18	CDX2	B04	26.11	26.18	26.18				
19	COL1A1	B05	28.44	28.48	28.66				

PlateSelect / PlateInfo / GeneID / TestSampleData / ControlSampleData / PCR amp eff / normalization factors / scatter_p

(4) Test Sample データの入力

次に、Test Sample 入力用のシート（TestSampleData）を選択します。Control Sample と同じ要領で Ct 値を入力します。入力が完了したら set sample data ボタンをクリックします。

データのクリア

データ入力をやり直す場合には clear ボタンをクリックします。すると、入力したすべてのデータが消去されます。

Ct 値の cutoff 値の設定

Ct 値の cutoff 値を設定すると、一定以上の Ct 値のデータを解析から除外することができます。デフォルトでは 35 サイクルに設定されており、Ct 値が 35 以上のデータは解析から除外されます。cutoff 値を変更する場合には、この Ct cutoff value の値を変更します。

(5) Normalization Factor の算出

set sample data ボタンをクリックすると、Normalization Factor 算出のシート（normalization_factors）に変わります。補正に用いるハウスキーピング遺伝子（HKG）＊[1] をチェックボックスで選択し、NF value ボタンをクリックします。すると、Normalization Factor が算出され、自動的に相対定量解析が行われます。

HKG		Test Sample		Control Sample	
		Quantity	SD_Q	Quantity	SD_Q
✔	GUSB	4.55E-08	2.68E-09	6.43E-08	6.29E-09
✔	HPRT1	9.16E-08	8.76E-09	1.28E-07	8.23E-09
✔	PGK1	4.87E-07	2.11E-08	8.71E-07	5.61E-08
✔	ACTB	2.50E-05	3.66E-06	3.29E-05	4.82E-06
✔	GAPDH	3.51E-06	1.75E-07	5.90E-06	2.49E-07
✔	TBP	1.56E-08	1.14E-09	2.82E-08	1.68E-09
✔	B2M	4.17E-06	2.46E-07	2.70E-06	2.47E-07
✔	PPIA	3.06E-06	0.00E+00	3.84E-06	0.00E+00

NF value

normalization factors	Quantity	SD_Q
NF Test		
NF Control		

＊1：ハウスキーピング遺伝子の選択について

Normalization Factor は反応に用いた鋳型量を補正するための係数で、サンプル間で発現量が安定しているハウスキーピング遺伝子（HKG）を指標として算出します。サンプル間で発現量が異なるハウスキーピング遺伝子を補正に用いると結果が不正確になりますので、その選択には注意が必要です。適切なハウスキーピング遺伝子を選択するには、実験的に確かめるか＊、既知の情報（生物学的知見、文献情報、マイクロアレイの解析結果等）を利用します。そのような情報も得られない場合には、全種類のハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして用いるか、RNA 量の補正を行わずに（全種類を非選択とする）解析を行います。

＊ 参考

・Housekeeping Gene Primer Set（製品コード 3790/3791/3792）説明書
・geNorm manual
http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf
・Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3 (7): RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

（6）解析結果の確認

解析後、Fold Difference の 3D profile が表示されます。その他の結果を見るには、各シートを選択します。

Fold Difference

Control Sample を 1 とした場合の Test Sample の相対定量値および標準偏差の一覧です。

Fold Difference					
		expression level		SD	
Well	Symbol	Test Sample	Contorol Sample	Test Sample	Contorol Sample
A01	CTNNB1	2.31	1.00E+00	4.08E-01	1.49E-01
A02	FLT1	0.03	1.00E+00	3.11E-03	3.64E-02
A03	FN1	13.64	1.00E+00	8.42E-01	4.52E-02
A04	LAMA1	0.21	1.00E+00	1.56E-02	3.81E-02
A05	PDX1	276.28	1.00E+00	1.38E+01	6.26E-02
A06	PTEN	160.90	1.00E+00	7.54E+00	6.11E-02
A07	CCL2	3.66E+04	1.00E+00	1.56E+03	1.88E-01
A08	ACTC1	321.80	1.00E+00	4.66E+01	1.85E-01
A09	AFP	0.61	1.00E+00	5.73E-02	9.84E-02
A10	CCR7		1.00E+00		1.72E-01

Scatter plot

左の表は、Control Sample に対して相対化する前の定量値と標準偏差の一覧です。その右には、それらの値が Scatter plot で表示されます。

Scatter Plot					
		expression level		SD	
Well	Symbol	Test Sample	Control Sample	Test Sample	Contorol Sample
A01	CTNNB1	2.94E-02	1.27E-02	5.19E-03	1.89E-03
A02	FLT1	3.53E-04	1.15E-02	3.56E-05	4.17E-04
A03	FN1	4.19E-02	3.07E-03	2.59E-03	1.39E-04
A04	LAMA1	1.52E-01	7.29E-01	1.14E-02	2.78E-02
A05	PDX1	1.41E-01	5.10E-04	7.03E-03	3.20E-05
A06	PTEN	3.04E+01	1.89E-01	1.42E+00	1.15E-02
A07	CCL2	1.61E+00	4.39E-05	6.84E-02	8.24E-06
A08	ACTC1	2.01E-02	6.25E-05	2.91E-03	1.15E-05
A09	AFP	1.20E-01	1.98E-01	1.14E-02	1.95E-02
A10	CCR7		7.75E-05		1.33E-05
A11	BRIX1	5.49E-02	8.44E-02	5.89E-03	4.04E-03
A12	GUSB	6.90E-02	7.20E-02	4.48E-03	7.34E-03
B01	CD34	1.07E-02	3.74E-04	3.45E-04	4.16E-05
B02	CD9	2.77E-02	3.20E-02	1.82E-03	7.84E-03
B03	CDH5	3.68E-04	4.83E-04	1.92E-05	1.13E-04
B04	CDX2	7.66E-02	1.49E-02	3.62E-03	5.99E-04
B05	COL1A1	3.20E-02	2.89E-03	1.43E-03	2.49E-04
B06	COL2A1	1.08E-02	1.79E-02	5.16E-04	1.02E-03
B07	COMMD3	7.37E-04	3.81E-03	6.47E-05	1.23E-04
B08	CRABP2	1.03E-02	1.54E-01	8.88E-04	1.23E-02
B09	DDX4	6.53E-02	3.75E-02	5.94E-03	2.91E-03
B10	DES	2.11E-01	1.98E-01	1.98E-02	1.31E-02
B11	DIAPH2	5.58E-03	1.15E-02	3.67E-04	6.08E-04
B12	HPRT1	1.39E-01	1.43E-01	1.38E-02	1.01E-02
C01	DNMT3B	1.05E-02	7.26E-03	6.88E-04	4.01E-04
C02	EDNRB				
C03	EOMES	1.02E-01	6.86E-02	6.68E-03	6.08E-03
C04	FGF4	9.63E-02	5.72E-01	6.03E-03	2.67E-02

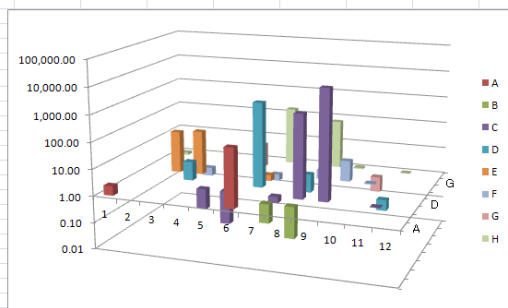
3D Profile

グラフの上には Plate と同じ配置で Test Sample の Fold Difference および遺伝子の Symbol の表が表示されます。Fold Difference の表は発現減少（0.5 以下）を青、変化なし（0.5 より大きく 2 未満）を灰色、発現増大（2 以上）を赤としています。

3D Profile	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.31E+00	3.08E-02	1.36E+01	2.09E-01	2.76E+02	1.61E+02	3.66E+04	3.22E+02	6.07E-01		6.51E-01	9.59E-01
B	2.86E+01	8.65E-01	7.63E-01	5.13E+00	1.11E+01	6.03E-01	1.93E-01	6.65E-02	1.74E+00	1.06E+00	4.86E-01	9.73E-01
C	1.44E+00		1.48E+00	1.68E-01	5.79E-02	8.59E-01	5.86E-01	1.37E+03	1.33E+04		9.73E-01	7.58E-01
D		1.23E+02	5.24E+00	7.56E+01		1.63E+03		4.76E+00	4.51E-01	4.36E+03	4.03E-01	1.03E+00
E	1.34E+01	3.89E+01	4.82E+01	4.25E+01		1.69E+00	8.59E-01	5.81E+01	1.44E+00			8.07E-01
F	6.60E-01	3.23E+00	4.86E-01	2.48E-01	4.31E+01	5.66E-01	5.62E+00	2.19E+00	6.23E+00	9.27E-01	1.28E+00	7.53E-01
G	6.60E-01	1.44E+00	1.71E+02	2.38E-01	7.73E+00	3.14E-01	3.45E+01	5.99E-01	1.69E+00	2.68E-01	6.60E-01	2.10E+00
H	8.01E-01	1.25E+00		2.16E+00	1.55E+00	1.58E+02	1.92E-01	6.76E+01	1.11E+00	4.63E+00	9.79E-01	1.08E+00

Symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTNNB1	FLT1	FN1	LAMA1	PDX1	PTEN	CCL2	ACTC1	AFP	CCR7	BRIX1	GUSB
B	CD34	CD9	CDH5	CDX2	COL1A1	COL2A1	COMMD3	CRABP2	DDX4	DES	DIAPH2	HPRT1
C	DNMT3B	EDNRB	EOMES	FGF4	FGF5	FOXA2	FOXD3	GABRB3	GAL	GATA4	GATA6	PGK1
D	GCG	GCM1	GDF3	GFAP	DCN	GRB7	HBZ	HCK	MNX1	IAPP	IFITM1	ACTB
E	IFITM2	NGFR	IL6ST	IGF2BP2	ISL1	KIT	KRT1	LAMB1	LAMC1	LEFTY1	LIFR	GAPDH
F	LIN28A	LCK	NANOG	NES	NEUROD1	NODAL	NPPA	NR5A2	NR6A1	NUMB	OLIG2	TBP
G	PAX4	PAX6	PECAM1	PODXL	POU5F1	REST	RUNX2	SEMA3A	SERPINA1	SFRP2	SOX17	B2M
H	SOX2	SYCP3	SYP	T	TAT	TDGF1	TERT	TFCP2L1	TH	WT1	ZFP42	PPIA

また以下の Category を選択し、Reload ボタンをクリックすることで指定 Category に該当する Symbol に発現増減の着色が行われ、該当データの FoldDifference を棒グラフで表示します。Category 全選択の場合は ALL ボタン、非選択の場合は Clear ボタンをクリックします。

Symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTNNB1					PTEN				CCR7		
B							COMMD3	CRABP2				
C		EDNRB		FGF4	FGF5		FOXD3	GABRB3	GAL		GATA6	
D			GDF3			GRB7		HCK			IFITM1	
E		NGFR	IL6ST			KIT				LEFTY1	LIFR	
F			NANOG			NODAL	NPPA	NR5A2	NR6A1	NUMB		
G					POU5F1					SFRP2		
H	SOX2					TDGF1		TFCP2L1	TH		ZFP42	

以上で解析は終了です。他のデータの解析を行う場合には、TestSampleData のシートで clear ボタンをクリックしてデータを消去し、（2）Plate の選択から始めてください。

III. トラブルシューティング

● セキュリティの警告が表示される

PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells はマクロを含んでいるため、セキュリティの警告が表示されることがあります。その場合には、マクロを有効にする操作を行ってください。

Microsoft® Office Excel® 2007 の場合

（1）セキュリティの警告のオプションをクリックする。

（2）「このコンテンツを有効にする」を選択して、OK ボタンをクリックする。